

## TRABAJO PRÁCTICO N° 2

### CADENA RESPIRATORIA. FOSFORILACIÓN OXIDATIVA

#### OBJETIVOS

- ✚ Describir el transporte de electrones a través de aceptores que experimentan cambios reversibles en su estado redox.
- ✚ Comprender y explicar los mecanismos de transformación de energía redox en energía química en forma de ATP: fosforilación oxidativa.
- ✚ Interpretar la acción de inhibidores y desacoplantes sobre el transporte electrónico.

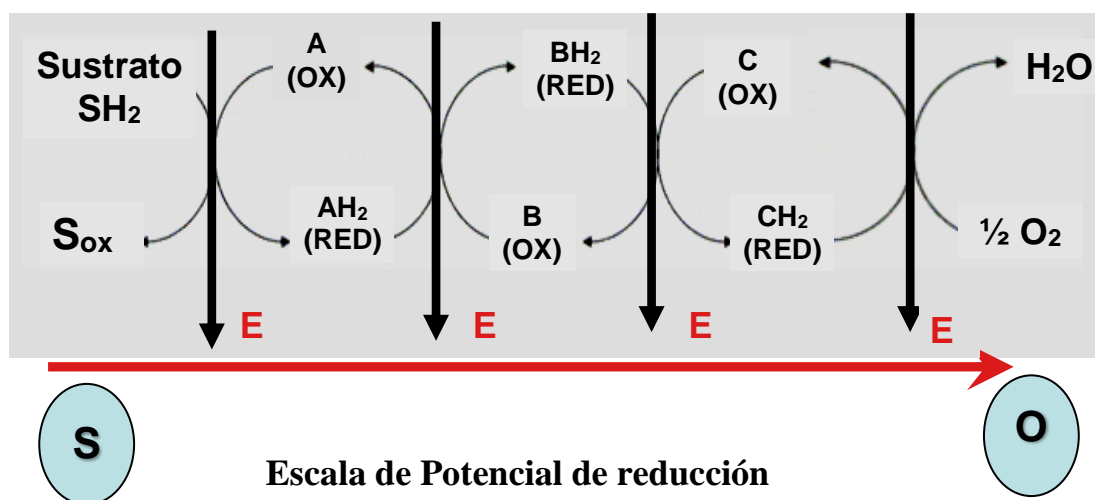
#### CADENA RESPIRATORIA: TRANSPORTE ELECTRÓNICO

En los organismos aerobios, las oxidaciones de sustancias provistas por los alimentos constituyen la principal fuente de energía utilizable para efectuar trabajo (síntesis química, transporte activo a través de membranas, locomoción, etc.). Una de las funciones principales de las mitocondrias es la de transformar la energía de óxido-reducción que se obtiene al degradar los alimentos, en energía química conservada en los enlaces fosfato de alta energía del ATP. La mayor parte de la síntesis de ATP se realiza en condiciones aeróbicas, durante la oxidación completa de carbohidratos, ácidos grasos y aminoácidos. Los restos carbonados de estos compuestos ingresan al Ciclo de Krebs, principalmente como Acetil-CoA y también como otros intermediarios del ciclo. Estos compuestos, al ser oxidados hasta  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$ , producen por medio de deshidrogenasas, equivalentes de reducción (protones y electrones) que son transportados a través de la cadena respiratoria de la membrana interna mitocondrial hasta el oxígeno, para formar agua.

Las oxidaciones pueden efectuarse por adición de oxígeno, por sustracción de hidrógeno, o por cualquier otra reacción que determine pérdida de electrones. Básicamente, la oxidación implica pérdida de electrones mientras que el proceso contrario, la reducción involucra ganancia de electrones. Las formas oxidadas y reducidas de un elemento, ión o compuesto constituyen un par o cupla redox. El potencial de reducción de un par redox **es una medida de la tendencia a ganar electrones**. Por convención, se considera como patrón de referencia la cupla redox  $\text{H}^+ / 1/2 \text{H}_2$ , a la cual se le asigna potencial de reducción cero.

En los organismos vivos, los electrones que pierde el sustrato cuando es oxidado no se transfieren directamente al oxígeno, sino que se efectúa en etapas sucesivas a través de distintos aceptores de electrones de potencial de reducción creciente.

En la membrana mitocondrial interna existen un grupo de moléculas aceptores de hidrógeno y/o electrones ( $H^+$  y  $e^-$  son llamados equivalentes de reducción) dispuestas ordenadamente, según un gradiente de potencial de reducción creciente (de menor a mayor potencial de reducción). Estos aceptores están asociados a enzimas que catalizan la transferencia de  $e^-$ . El conjunto recibe el nombre de Cadena Respiratoria o Cadena de Transporte Electrónico. El proceso se esquematiza en la figura 2.1. Un sustrato  $SH_2$  es oxidado a  $S_{ox}$  por un compuesto **A** (de mayor potencial de reducción). El sustrato cede sus electrones a **A** que se reduce a  $AH_2$ . La liberación de energía **E** es proporcional a la diferencia entre los potenciales de reducción del sustrato y A. Las etapas siguientes ocurren de la misma manera. De modo que la energía es liberada en forma fraccionada y puede ser captada y utilizada por las células.



**Fig 2.1** Representación esquemática de una oxidación biológica.

En las primeras etapas, en la cadena respiratoria, se transfieren juntos los dos protones y los dos electrones del par de hidrógenos cedidos por el sustrato. Luego los protones quedan en el medio acuoso de la matriz mitocondrial y sólo los electrones continúan su pasaje de un aceptor al siguiente en escala de potencial. El aceptor final de los electrones ( $e^-$ ) es el **oxígeno**.

En la matriz mitocondrial se encuentran las deshidrogenasas ligadas a NAD (nicotinamida adenina dinucleótido) que oxidan sus sustratos generando  $NADH + H^+$ . Los equivalentes de reducción (hidrógenos y electrones) del sustrato que se oxida son cedidos por la coenzima NADH a la cadena respiratoria, que está integrada por los siguientes componentes:

**a) NADH-ubiquinona reductasa (complejo I):** contiene flavina mononucleótido (FMN) y de 5 a 8 centros proteicos ferrosulfurados. Los equivalentes de reducción ( $H^+$  y  $e^-$ ) de NADH son captados por la coenzima FMN que se convierte en  $FMNH_2$ , a continuación pasan  $e^-$  sucesivamente por los

átomos de  $\text{Fe}^{3+}$  de los centros Fe-S, que los captan reversiblemente. Los  $\text{e}^-$  son cedidos finalmente a la coenzima Q (Ubiquinona). Durante este transporte se reoxidan el FMNH<sub>2</sub> y los átomos de  $\text{Fe}^{2+}$  y se reduce la CoQ a CoQH<sub>2</sub>, también ocurre translocación de  $\text{H}^+$  hacia el espacio intermembrana.

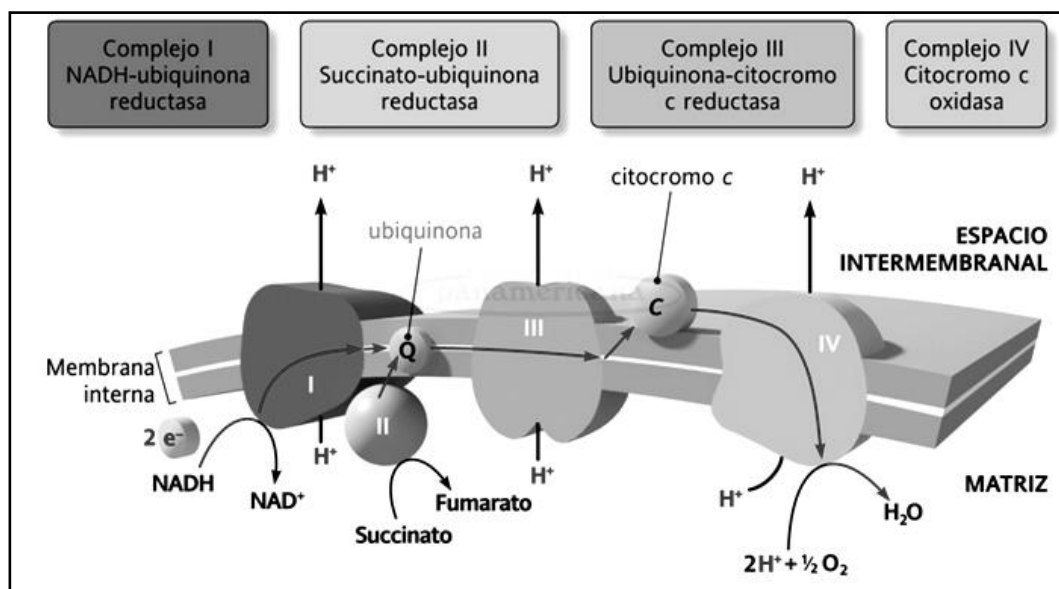
**b) Succinato-ubiquinona reductasa (complejo II):** este complejo está formado por una enzima (*succinato deshidrogenasa*) que cataliza la oxidación de succinato, es una flavoproteína que posee como grupo prostético flavina adenina dinucleótido (FAD) y 3 centros proteicos Fe-S. Los equivalentes de reducción ( $\text{H}^+ + \text{e}^-$ ) provenientes de la oxidación del succinato son cedidos al FAD y se forma FADH<sub>2</sub>. Este último transfiere los  $\text{e}^-$  a la CoQ que se reduce a CoQH<sub>2</sub>.

**c) Coenzima Q o Ubiquinona:** Es el único aceptor del sistema de transporte electrónico no unido a proteínas. Recibe el nombre de “ubiquinona” porque su distribución es “ubicua” en los sistemas biológicos. Su estructura química es una benzoquinona con una larga cadena formada por unidades de isopreno. Su larga cadena isoprenoide hidrófoba le permite alojarse en la bicapa lipídica de la membrana mitocondrial y actuar como un transportador móvil de  $\text{H}^+$  y  $\text{e}^-$ . La coenzima Q recibe equivalentes de reducción que proceden tanto de sustratos oxidados por enzimas dependientes de NAD como de sustratos oxidados por enzimas ligadas a FAD. La CoQH<sub>2</sub> cede dos  $\text{e}^-$  al complejo ubiquinona-citocromo reductasa y deja dos protones libres en el medio.

**d) Ubiquinona-citocromo c reductasa (complejo III):** este complejo está formado por los citocromos b<sub>566</sub>, b<sub>562</sub> y c<sub>1</sub> y por un centro proteico Fe-S. Los citocromos son hemoproteínas en las cuales el Fe del grupo hemo, que forma parte de los citocromos, capta reversiblemente un electrón, al igual que el Fe de los centros ferrosulfurados. Desde la ubiquinona-citocromo reductasa los  $\text{e}^-$  del citocromo c<sub>1</sub> son transferidos al citocromo c. A nivel de este complejo también hay translocación de  $\text{H}^+$  hacia el espacio intermembrana.

**e) Citocromo c:** es una hemoproteína ubicada sobre la cara exterior de la membrana mitocondrial interna, se encuentra unida a ella por interacciones electrostáticas pudiendo ser separada fácilmente en el laboratorio por tratamiento con soluciones salinas. El citocromo c es también un transportador móvil de electrones, recibe electrones del complejo III y los entrega al complejo citocromo oxidasa o complejo IV.

**f) Citocromo oxidasa (complejo IV):** está formado por varias cadenas polipeptídicas que atraviesan todo el espesor de la membrana, posee dos citocromos ( $a$  y  $a_3$ ) y dos átomos de  $\text{Cu}^{2+}$ . Es el único componente de la membrana con capacidad para transferir electrones al  $\text{O}_2$ . Una molécula de oxígeno capta 4  $e^-$  y se une a 4  $\text{H}^+$  para formar dos moléculas de  $\text{H}_2\text{O}$ . También hay translocación de  $\text{H}^+$  hacia el espacio intermembrana.



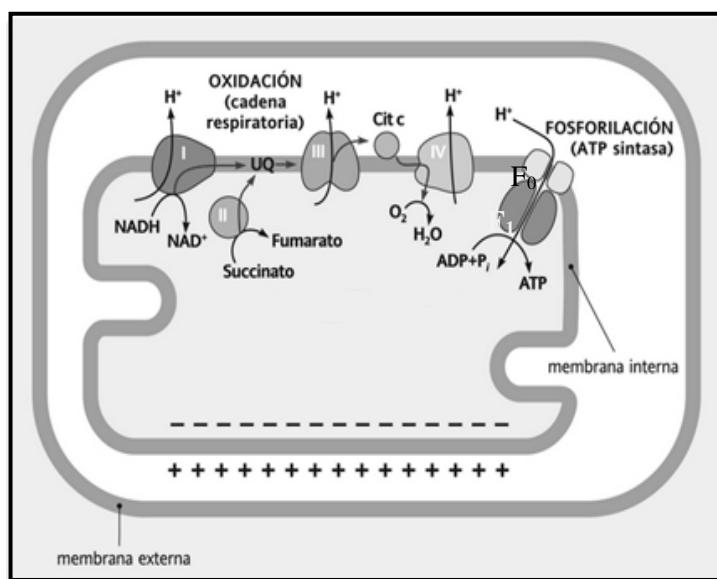
**Fig 2.2.** Transporte de electrones a lo largo de la cadena transportadora de electrones. Feduchi, Blasco, Romero, Yañez. "Bioquímica. Conceptos esenciales". 1º Edición.

La reducción parcial del oxígeno puede dar lugar a la formación de especies reactivas del oxígeno como el anión superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) o el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), que cuando superan los niveles normales en la célula son productos tóxicos. La interacción entre  $\text{O}_2^-$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$  forma radicales hidroxilo ( $\text{HO}^\bullet$ ), altamente reactivos. El nivel de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y radicales libres se mantiene muy bajo en los tejidos gracias a sistemas de defensa, ya sea enzimáticos o no enzimáticos. Enzimas como la *superóxido dismutasa*, la *catalasa* y las *peroxidasas*, catalizan la eliminación de  $\text{O}_2^-$  o  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Dentro de los sistemas no enzimáticos se encuentran en las células sustancias antioxidantes como el tocoferol o vitamina E, los carotenos (provitamina A) y el ácido ascórbico o vitamina C.

## FOSFORILACIÓN OXIDATIVA

La energía producida por la transferencia de electrones es usada para sintetizar ATP. La energía redox del transporte electrónico se utiliza para expulsar  $\text{H}^+$  al exterior de la matriz mitocondrial (a nivel de los complejos I, III y IV), formándose un gradiente de concentración de  $\text{H}^+$ . La mayor concentración de protones en el espacio intermembrana respecto de la matriz mitocondrial,

crea también una diferencia de carga a ambos lados de la membrana (positiva en el lado externo y negativa hacia el lado de la matriz). Al ser la membrana mitocondrial interna impermeable a los protones, sólo pueden ingresar a través de un complejo proteico denominado *ATP sintasa*, este pasaje de protones proporciona la energía necesaria para la síntesis de ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico (Pi). El proceso se denomina “fosforilación oxidativa” y la **teoría** que explica dicho mecanismo es la “**teoría quimio-osmótica**”. La síntesis de ATP ocurre en las partículas submitocondriales F<sub>1</sub> que integran la estructura de la *ATP sintasa* (ver figura 2.3).



**Fig 2.3.** Esquema representativo de la hipótesis quimiosmótica. Feduchi, Blasco, Romero, Yañez. “Bioquímica. Conceptos esenciales”. 1º Ed.

### Inhibidores del transporte electrónico y/o de la síntesis de ATP

Algunos agentes químicos actúan inhibiendo la transferencia de electrones en sitios específicos de la cadena de transporte electrónico, impidiendo en consecuencia, la síntesis de ATP (Tabla 2.1).

Compuesto	Comentario	Modo de Acción
Rotenona Amital	Insecticida Barbitúrico: induce el sueño	Impiden la transferencia electrónica desde Fe-S a la CoQ
Antimicina A	Antibiótico	Bloquea la transferencia electrónica desde cit. b a cit. c <sub>1</sub> (Complejo III)



Cianuro		Inhiben la citocromo oxidasa
Monóxido de carbono		

Tabla 2.1 Inhibidores del Transporte Electrónico

Existen otros inhibidores denominados “inhibidores de la fosforilación” que bloquean directamente la fosforilación, pero al estar el sistema fuertemente acoplado, también se inhibe el transporte electrónico (Tabla 2.2).

Compuesto	Comentario	Modo de acción
Oligomicina	Antibiótico	Bloquea el flujo de protones a través de $F_0$ .

Tabla 2.2 Bloqueantes de la Fosforilación Oxidativa

### Desacoplantes del transporte electrónico y la fosforilación oxidativa

Se denominan “desacoplantes” aquellos compuestos que desconectan o desacoplan el transporte electrónico de la fosforilación oxidativa, impidiendo la síntesis de ATP, sin inhibir el flujo de electrones hacia el  $O_2$ . Estos compuestos pueden ser de origen químico como por ejemplo el 2,4-dinitrofenol y el dicumarol, como así también de origen fisiológico como la proteína denominada “termogenina” que se encuentra en la grasa parda presente en niños principalmente, en algunas zonas del cuerpo de personas adultas y en animales que hibernan.

Estos agentes son sustancias liposolubles o sustancias que forman poros en la membrana, las cuales actúan translocando protones desde el espacio intermembrana hacia la matriz mitocondrial, aboliendo el gradiente de protones formado por el transporte electrónico. De esta forma, se disipa la fuerza motriz protónica necesaria para la activación de la *ATP sintasa* y la síntesis de ATP. Esto provoca un aumento en la velocidad de respiración celular, hay mayor producción de agua y la energía proveniente de la oxidación de sustratos es liberada en forma de calor.

### BIBLIOGRAFÍA

- BLANCO, A., "Química Biológica", Ed. El Ateneo, 8° Edición, Bs. As., 2006. Reimpresión año 2007.
- FEDUCHI, E, BLASCO I, ROMERO, C , YAÑEZ, E. Bioquímica. Conceptos esenciales, Editorial Panamericana, 1° Ed., 2010. Reimpresión año 2011.
- LEHNINGER, A.L., NELSON, D., COX, M., "Principios de Bioquímica", Editorial Omega, S.A., 4° Ed., 2006. Reimpresión año 2008.

**TRABAJO PRÁCTICO N° 2**  
**CADENA RESPIRATORIA. FOSFORILACIÓN OXIDATIVA**

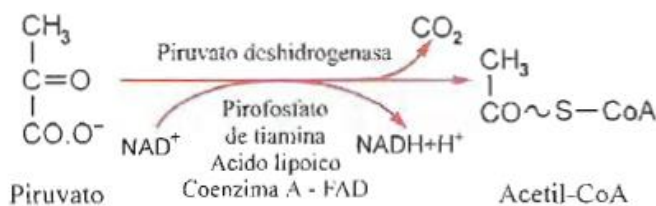
**PROBLEMAS DE APLICACIÓN**

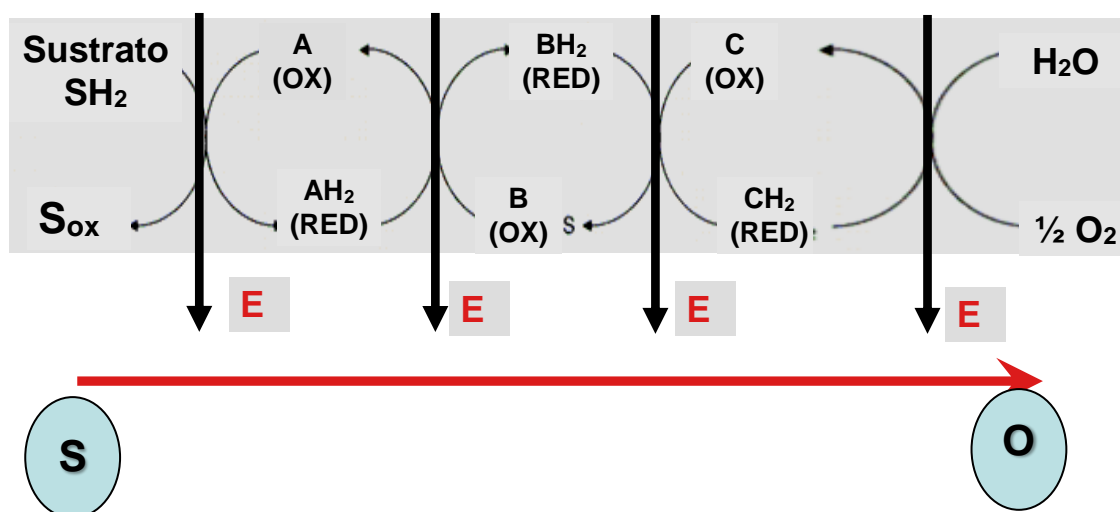
1. El catabolismo de nutrientes permite una liberación controlada de la energía contenida en los enlaces de carbono. Dar ejemplos de los tres tipos de compuestos, mencionados en a, b y c. Relacionar los ítems de la columna de la izquierda con los correspondientes en la columna derecha:

a) Nutrientes	1) Son coenzimas derivadas de vitaminas
b) Moléculas transportadoras de electrones	2) Son oxidados en reacciones exergónicas
c) Moléculas transportadoras de energía	3) Capturan la energía liberada de los alimentos
	4) Almacenan energía química que es directamente utilizada por la célula para la síntesis de compuestos.
	5) Tienen la capacidad de oxidarse y reducirse
	6) Es sintetizado en reacciones acopladas al catabolismo de nutrientes

2. Numerosos sustratos oxidables de distinta naturaleza como piruvato,  $\alpha$ -cetoglutarato, malato, isocitrato, glutamato son deshidrogenados en la matriz mitocondrial en reacciones catalizadas por enzimas específicas (deshidrogenasas) cuya coenzima es un nucleótido de nicotinamida.

a) A través del siguiente esquema indique como son transferidos los hidrógenos a través de los distintos aceptores de la cadena respiratoria luego de la oxidación de piruvato (considere  $\text{SH}_2 = \text{NADH}_2$ ).





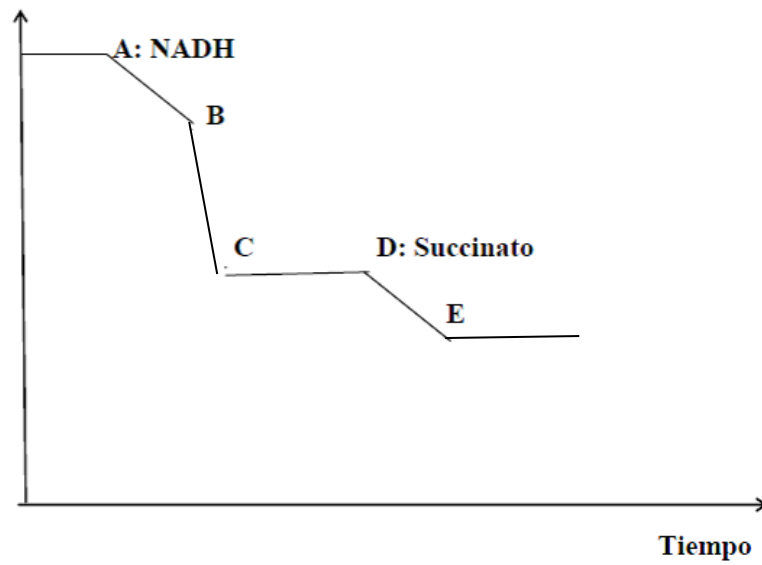
3. Una suspensión de mitocondrias consume  $24 \mu\text{mol O}_2/\text{min}$  en presencia de piruvato. Al agregar  $2,8 \text{ mmoles}$  de ADP y Pi en exceso el consumo se acelera a  $211 \mu\text{mol O}_2/\text{min}$  durante 3 min para luego retornar a la velocidad inicial. Explique a qué se debe la aceleración transitoria del consumo de oxígeno y analice cómo afectaría un desacoplante la velocidad de consumo de oxígeno y el índice P/O.

4. El gráfico muestra el trazado obtenido en un oxígrafo al incubar partículas submitocondriales a  $30^\circ\text{C}$ , en un medio a pH: 7,5. Caracterice cada uno de los compuestos agregados (B, C y E.) como inhibidores del transporte electrónico, la fosforilación oxidativa o desacoplante. Justifique brevemente el efecto de cada compuesto sobre la velocidad de consumo de  $\text{O}_2$ .





Concentración  
de  $O_2$



5. Durante la II Guerra Mundial, los soldados que lucharon durante el invierno ruso recibieron un compuesto denominado 2,4-Dinitrofenol (DNP), con el objetivo de mantener una temperatura corporal elevada. Conociendo que este compuesto es un desacoplante de la fosforilación oxidativa, justifique por qué el DNP produce este efecto y qué riesgos para la salud derivan de su uso.



### PROBLEMAS PROPUESTOS

1. Las células obtienen energía química en forma de ATP a partir del catabolismo de nutrientes (hidratos de carbono, lípidos y aminoácidos). Esta energía la utilizan para:

- a).....
- b).....
- c).....

2. El receptor de los electrones del NADH es:

- a) Un centro sulfo-férrico del complejo I
- b) La ubiquinona
- c) El FMN del complejo I
- d) El complejo II

3. El receptor de los electrones del  $\text{FADH}_2$

- a) Un centro sulfo-férrico del complejo I
- b) La ubiquinona
- c) El FMN del complejo I
- d) El complejo II

4. ¿En presencia de un compuesto que inhibe la cadena de transporte electrónico, diga qué complejo estará afectado si la Coenzima Q y el citocromo c están reducidos, pero no se observa consumo de oxígeno?

5. Diga de dónde proviene la energía necesaria para la síntesis de ATP. Realice un esquema del complejo  $\text{F}_1\text{-F}_0$  de *ATP sintasa* para justificar la síntesis de ATP.

[Escriba aquí]